

**Makromolekulare Kristallographie bei atomarer Auflösung:
Synthetische Nukleinsäurefragmente und bakterielle
Kälteschockproteine**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
- Dr. rer. nat. -
am Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Diplom-Chemiker

Uwe Müller

Berlin 1999

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom September 1994 bis März 1999 unter der Anleitung von Prof. Dr. Udo Heinemann am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hartl

Eingereicht am: 6. April 1999

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 1999

Für Ines, Marlene
und Alexander

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.0. Die Bedeutung der Auflösung bei Kristallstrukturanalysen	1
1.1. Der Akzeptorstamm der tRNA^{Ala} aus <i>Escherichia coli</i>	2
1.1.1. Nukleinsäuren	2
1.1.2. Die tRNA-Erkennung durch die Aminoacyl-tRNA Synthetasen	3
1.1.3. Die tRNA ^{Ala} aus <i>Escherichia coli</i>	4
1.1.4. Aufgabenstellung	6
1.2. DNA-RNA Hybridstrukturen im Replikationszyklus des HIV-Virus	7
1.2.1. Die 3'-DNA-RNA-5' Hybridstruktur bei der Replikation des HIV-I Virus	7
1.2.2. Aufgabenstellung	8
1.3. Das Kälteschockprotein <i>Bc-Csp</i> aus <i>Bacillus caldolyticus</i>	8
1.3.1. Proteine	8
1.3.2. Proteininstabilität	9
1.3.3. Das Hauptkälteschockprotein Csp	11
1.3.4. Faltungskinetiken und der Konformationsstabilität der Kälteschockproteine	13
1.3.5. Aufgabenstellung	14
2. MATERIALIEN UND METHODEN	15
2.1. Hybridisierung und Reinigung der Nukleinsäuren	15
2.1.1. Der tRNA ^{Ala} -Akzeptorstamm	15
2.1.2. Die HIV ^{Chi} -Helix	16
2.2. Kristallisation der Nukleinsäuren	17
2.3. Kristallisation von <i>Bc-Csp</i> und <i>Bc-Csp</i>^{R3E}	19
2.4. Das Diffraktionsexperiment	20
2.4.1. Die Synchrotronstrahlungsquelle	20
2.4.2. Das Tieftemperatur-Diffraktionsexperiment	22
2.4.2.1. Die Kristallmontage	22
2.4.2.2. Das Diffraktionsexperiment	23
2.4.3. Prozessierung der Meßdaten	25
2.5. Die Methode des Isomorphen Ersatzes der tRNA^{Ala}-Helix	27
2.6. Die Methode des Molekularen Ersatzes bei HIV^{Chi} und <i>Bc-Csp</i>	33
2.6.1. Die Kreuzrotationsfunktion	33
2.6.2. Die Translationsfunktion	34

2.7. Detektion und Dekonvolution von Fehlordnungsstrukturen	35
2.8. Strukturverfeinerung von HIV^{Chi} mit XPLOR-V3.8	38
2.9. Verfeinerung von ALA^{wt}, ALA^{C70} und Bc-Csp mit SHELXL-97	42
2.9.1. Die Verfeinerung von ALA ^{wt} , ALA ^{I-U6} und ALA ^{C70}	43
2.9.2. Die Verfeinerung von Bc-Csp und Bc-Csp ^{R3E}	46
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	49
3.1. Kristallstrukturanalyse von ALA^{wt} und ALA^{C70}	49
3.1.1. Kristallisation und Diffraktionsexperiment	49
3.1.2. Die Strukturlösung und Verfeinerung von ALA ^{wt} und ALA ^{C70} in C2	53
3.1.2.1. Molekularer Ersatz	53
3.1.2.2. Strukturanalyse von ALA ^{wt} unter Verwendung der SIRAS-Methode	56
3.1.2.3. Verfeinerung von ALA ^{wt} und ALA ^{C70} in der monoklinen Raumgruppe C2	61
3.1.3. Alternative Strukturlösung und Verfeinerung der tRNA ^{Ala} -Mikrohelix in P1	63
3.1.3.1. Positionierung der RNA-Duplexe in P1 durch den Molekularen Ersatz	63
3.1.3.2. Zwillingsverfeinerung von ALA ^{wt} , ALA ^{C70} und ALA ^{I-U6}	64
3.1.4. Die Organisation der RNA-Duplexe im Kristallgitter	68
3.1.5. Die Auswertung der globalen Helixparameter	69
3.1.6. Der Vergleich der verfeinerten Strukturmodelle durch Superpositionierung	71
3.1.7. Vergleich der sequenzabhängigen helikalen Parameter	74
3.1.8. Zuckerwellung und Torsionswinkel des Phosphatrückgrats	75
3.1.9. Die Struktur des G3•U70- und des G3-C70-Basenpaars	78
3.1.10. Solvenz- und Kationenstruktur bei atomarer Auflösung	81
3.2. Kristallstrukturanalyse eines 3'-DNA-RNA-5'-Hybrids aus HIV-I	85
3.2.1. Kristallisation und Diffraktionsexperiment	85
3.2.2. Strukturlösung von HIV ^{Chi} mittels Molekularen Ersatzes	87
3.2.3. Strukturverfeinerung von HIV ^{Chi} mit XPLOR-3.8	88
3.2.4. Organisation der HIV ^{Chi} Oktamere im Kristall	90
3.2.5. Solvenzstruktur von HIV ^{Chi}	93
3.2.6. Auswertung der globalen Oktamerstruktur	93
3.2.7. Vergleich der sequenzabhängigen helikalen Parameter	96
3.2.8. Analyse des c2-G15/a3-T14-Bereichs von HIV ^{Chi}	97
3.3. Kristallstrukturanalyse von Bc-Csp und der Bc-Csp^{R3E}-Mutante	101
3.3.1. Kristallisations- und Diffraktionsexperimente	101
3.3.2. Strukturanalyse in der tetragonalen Raumgruppe I4 ₁ von Bc-Csp	104
3.3.3. Strukturverfeinerung von Bc-Csp und Bc-Csp ^{R3E} mit SHELXL	106
3.3.4. Die Qualität der verfeinerten Strukturmodelle von Bc-Csp und Bc-Csp ^{R3E}	108
3.3.5. Die Struktur von Bc-Csp und Bc-Csp ^{R3E}	113
3.3.6. Der Vergleich der Csp-Strukturen	117
3.3.7. Seitenketten mit alternativen Konformationen	122
3.3.8. Die Solvenz-, Kationen-, und Ligandenstruktur von Bc-Csp	125
3.3.9. Die Organisation von Bc-Csp im Kristall	127
3.3.10. Mögliche strukturelle Determinanten der erhöhten Thermostabilität von Bc-Csp	128

3.4. Besonderheiten der Kristallstrukturanalyse biologischer Makromoleküle bei atomarer Auflösung	130
4. ZUSAMMENFASSUNG	132
4.1. Kristallstrukturanalyse von ALA ^{wt} und ALA ^{C70}	132
4.2. Kristallstrukturanalyse eines 3'-DNA-RNA-5' Hybrids aus <i>HIV-I</i>	133
4.3. Kristallstrukturanalyse von <i>Bc-Csp</i> und der <i>Bc-Csp</i> ^{R3E} -Mutante	134
5. SUMMARY	136
5.1. Crystal Structure of ALA ^{wt} and ALA ^{C70}	136
5.2. Crystal Structure of a 3'-DNA-RNA-5' Hybrid from HIV-1	137
5.3. Crystal Structure of <i>Bc-Csp</i> and the <i>Bc-Csp</i> ^{R3E} mutant	138
6. LITERATURVERZEICHNIS	139
6.1. Publikationsliste	150
7. ANHANG	151
7.1. Abbildungsverzeichnis	151
7.2. Tabellenverzeichnis	154
7.3. Nukleinsäurebausteine	156
7.4. Standard-Aminosäuren	157

Danksagung

Curriculum Vitae

Eidesstattliche Erklärung

4. Zusammenfassung

4.1. Kristallstrukturanalyse von ALA^{wt} und ALA^{C70}

Die Haupterkennungssignale für die spezifische Erkennung der tRNA^{Ala} aus *E. coli* durch die AlaRS sind im Akzeptorstamm dieses Moleküls lokalisiert. Ein über alle Lebensformen konserviertes G3•U70-Basenpaar stellt hierbei das Haupterkennungselement dar. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Strukturanalyse des heptameren Akzeptorstamms ALA^{wt} und der inaktiven C70-Mutante, ALA^{C70}, sollte Hinweise über die strukturelle Basis dieser Erkennungsmechanismen von der Seite der RNA geben. Daneben sollte diese Studie einen Einblick in das strukturelle Verhalten und die Auswirkungen eines G•U "wobble"-Basenpaars innerhalb eines Watson-Crick -gepaarten Doppelstrangs geben.

Alle untersuchten heptameren RNA-Helices konnten bei hoher bis atomarer Auflösung beschrieben werden. Weiterhin findet in allen Kristallen eine Fehlordnung über die pseudo-zweizählige Achse der Duplexmoleküle statt. Die Verfeinerung der Strukturen fand unter der Annahme eines pseudo-merohedralen Zwillings in der triklinen Raumgruppe P1 statt. ALA^{wt} und ALA^{C70} gehören zum A-RNA Konformationstyp. Die globale Struktur von ALA^{wt} wird durch das G3•U70-Basenpaar nicht verändert. Es findet lediglich eine lokale Modulation des helikalen Twists im Bereich von G3•U70 statt. Die C3'-endo Zuckerwellung aller Ribosen, mit Ausnahme der C2'-exo Konformation von G1 des Moleküls ALA^{wt}-A, und die Konformation des Polyphosphatrückgrats von ALA^{wt} und ALA^{C70} entsprechen den Standardgeometrien von A-RNA. Damit konnten die Ergebnisse der im Vorfeld an einem vergleichbaren RNA-Molekül durchgeführten NMR-Studien (Limmer *et al.*, 1996; Ramos & Varani, 1997) nicht bestätigt werden. Der Vergleich aller untersuchten Eigenschaften zwischen ALA^{wt} und ALA^{C70} führte zu keinen Hinweis auf eine globale Strukturänderung der Doppelhelix durch die Insertion des G3•U70-Basenpaars. Die Beschreibung der Struktur des G3•U70-Basenpaars bei atomarer Auflösung beweist seine Stabilisierung durch die Wechselwirkung mit Wassermolekülen, die in der kleinen und großen Furche sowie entlang des Polyphosphatrückgrats lokalisiert sind. Die "wobble"-Konformation, wie auch die Solvenzstruktur des G3•U70-Basenpaars stellen die Hauptunterscheidungsmerkmale im Vergleich mit dem G3-C70-Basenpaar dar. Somit besitzt der tRNA^{Ala}-Akzeptorstamm mit G3•U70 ein einzigartiges Erkennungssignal, welches durch die mögliche direkte Interaktion der AlaRS für die spezifische Erkennung benutzt wird. Das hochkonservierte Wassermolekül, welches eine kleine Kavität zwischen G3 und U70 in der kleinen Furche besetzt, kann als integraler Bestandteil von G•U-Basenpaaren angesehen werden. Damit

erweitert es mögliche Erkennungseigenschaften des Akzeptorstambereichs bei der Erkennung der AlaRS. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen die Hypothese der direkten Erkennung der tRNA^{Ala} durch die AlaRS (siehe **Abschnitt 1.1.3**). Die weiterführende Beantwortung der Frage nach den Wechselwirkungseigenschaften der AlaRS mit der tRNA^{Ala} wird aber erst nach zusätzlichen strukturanalytischen Untersuchungen wie der Kristallstrukturanalyse des tRNA-Synthetasen-Komplexes möglich sein.

4.2. Kristallstrukturanalyse eines 3'-DNA-RNA-5' Hybrids aus *HIV-I*

Das chimären Oktamer HIV^{Chi} dient als Modell für die Beschreibung der 3'-DNA-RNA-5' Verknüpfung, welches bei der Initiation der Minus-Strang-Synthese der HIV-Replikation gebildet wird. HIV^{Chi} kristallisiert mit zwei identischen Oktamerduplexen in der asymmetrischen Einheit. Beide Moleküle liegen in der A-Konformation vor. Dies beinhaltet eine C3'-endo Zuckerwellung für alle 32 Ribosen bzw. Desoxyribosen. Der Vergleich der tetrameren RNA-RNA- sowie RNA-DNA-Duplexhälften, sowie die Analyse des Übergangsbereichs ergab keine signifikanten Unterschiede, die durch die Basenpaarung von RNA mit DNA-Nukleotiden erklärt werden könnte. Die Überlagerung der beiden unabhängig voneinander verfeinerten Kopien zeigt eine hohe Flexibilität der Duplexmoleküle auf. Grund dafür sind unterschiedliche Umgebungen für die Moleküle innerhalb des Kristallgitters. Die Überlagerung beider Oktamerduplexe mit modellierter kanonischer A-RNA bestätigt die globale A-Konformation der untersuchten Helix. Die sequenzabhängige Analyse der Helixparameter ergab eine geringe Korrelation beim Vergleich der beiden Kopien. Lediglich der helikale Twist (Ω), der "Slide"-Wert (Dy) sowie die Steighöhe (Dz) sind mit der Basenpaarabfolge korreliert. Die Analyse ergab weiterhin ein globales Minimum für diese drei Werte, die den Basenpaarschritt c2-G15/a3-T14 beschreiben. Dieser Pyrimidin-Purin-Schritt führt durch seine speziellen Stapel­eigenschaften zu einer Flexibilisierung dieses Bereichs. Ein Resultat davon ist eine erweiterte Phosphatrückgrat-Konformation des 5'c2pa3-3' Schritts bei HIV^{Chi}-B. Entgegen der (-)gauche/trans/(+)gauche Konformation für $\alpha/\beta/\gamma$, die bei allen anderen Nukleotidschritten auftritt, entspricht dieser Schritt einer trans/trans/trans Konformationen. Obwohl diese strukturelle Abweichung nicht zwingend für die Ausbildung der Struktur des speziellen c2-G15/a3-T14 Schrittes ist, läßt dieser flexible Bereich die erweiterte Rückgratkonformation zu. Über die Möglichkeit einer Signalwirkung dieser strukturellen Variation bei der Erkennung des genomischen RNA-Strangs durch die der Reversen Transkriptase assoziierte RNase-H Funktion von

HIV, darf spekuliert werden. Trotzdem grenzen die identifizierten Spaltstellen genau an den beschriebenen c2-G15/a3-T14-Basenpaarschritt. Das ebenfalls vorhandene chemische Signal, welches durch den Übergang des tRNA^{Lys,3}-Primer RNA-Strang in den neu synthetisierten DNA-Strang durch das Wegfallen der stark solvenzexponierten 2'OH Gruppe der Ribose permanent vorhanden ist, könnte hierbei jedoch von größerer Bedeutung sein.

Der Vergleich des kristallographischen Strukturmodells von HIV^{Chi} mit dem zeitgleich generierten NMR-Strukturmodell, war wegen der Unzugänglichkeit der Strukturdaten im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich (Szyperski *et al.*, 1999).

4.3. Kristallstrukturanalyse von *Bc-Csp* und der *Bc-Csp*^{R3E}-Mutante

Die Kristallstrukturen von *Bc-Csp* und seiner R3E-Mutante konnten bei atomarer Auflösung mit einer großen Genauigkeit bestimmt werden. Beide Proteine kristallisieren isomorph in der tetragonalen Raumgruppe I4₁ mit zwei Proteinmolekülen in der asymmetrischen Einheit. Diese bilden Homodimere aus, deren Struktur sich von der Dimerstruktur von CspB unterscheidet. Die dreidimensionale Struktur des *Bc-Csp* Monomers entspricht nahezu der von CspB. Es konnten lediglich geringfügige Abweichungen des Hauptkettenverlaufs innerhalb flexibler Schleifenbereiche identifiziert werden. Diese Abweichungen konnten teilweise bezüglich einer erhöhten Stabilität der Polypeptidkette durch zusätzliche Wechselwirkungen bei *Bc-Csp* interpretiert werden. Die spezifische Bindung eines Na⁺-Kations im Bereich von Schleife 2 stabilisiert die β -Faltblattstruktur zwischen Strang β 2- β 3. Von besonderem Interesse ist die Analyse des Bereichs der E3R- und A46E-Mutationen beim Übergang vom mesophilen zum thermophilen Protein. *Bc-Csp* ist in der Lage, eine stabilisierende Salzbrücke zwischen R3 und E46 unter zusätzlicher Stabilisierung durch den Rest K5 auszubilden. Diese Salzbrücke ist solvenzexponiert. Die Ausbildung dieser Salzbrücke scheint aber nicht unbedingt zwingend für den nativen Zustand des Proteins zu sein, da sie nur bei einem Molekül in der asymmetrischen Einheit vorhanden ist. Obwohl die Punktmutation R3E bei *Bc-Csp* einen signifikanten Verlust an Thermostabilität von etwa 6 kJ/mol bewirkt (Perl, 1997), ist beim Vergleich der Kristallstrukturen lediglich ein Einfluß auf die Konformation weniger Seitenketten im Mutationsbereich erkennbar. Der Verlust der solvenzexponierten R3-E46 Salzbrücke kann den Verlust an Thermostabilität alleine nicht erklären. Die kürzlich an einer *Bc-Csp* E46A-Mutanten durchgeführten thermischen Entfaltungsexperimente zeigen eine sehr geringe thermische Destabilisierung im Vergleich mit *Bc-Csp*^{R3E} (Perl, 1999). Um die

4. Zusammenfassung

stabilisierenden Eigenschaften des thermophilen Proteins verstehen zu können, sind alle Einflüsse, die aus der Veränderung der Primärstruktur beim Übergang von CspB nach *Bc*-Csp resultieren, einzubeziehen. Der Vergleich der dreidimensionalen Strukturen beider Proteine stellt dabei eine der gegenwärtig zur Verfügung stehenden Möglichkeiten dar. Obwohl lediglich 12 Aminosäuren die unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine bestimmen, ist es nicht möglich, diese Austausche und Deletionen vollständig in Bezug auf die Fragestellung zu verstehen. Vielmehr sind weitere biophysikalische Experimente mit Einzelmutanten von *Bc*-Csp geplant, die in Verbindung mit deren strukturanalytischen Untersuchungen die Datenbasis für das Verständnis der Stabilität und Faltung dieser Proteine erweitern.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Udo Heinemann bedanken. Er schuf in seiner Arbeitsgruppe eine besondere Atmosphäre der Offenheit und des Vertrauens die es mir ermöglichte, meine Promotion zu meistern. Dazu gehört natürlich auch die wissenschaftliche Betreuung durch Ihn, die seine Bezeichnung als mein "Doktorvater" im Besonderen verdient.

Die enge Zusammenarbeit mit der ersten Generation von Mitarbeitern seiner Gruppe am MDC bleibt mir in guter Erinnerung. Danke hiermit an Michael Hahn, Klaas Decanniere, Marco Rogowski, Jaqueline Aj, Thomas Schwartz und Astrid Hoffmann.

Hier mein Dank an die festangestellten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, Gisela Sklenar, Anette Feske, Bigit Cloos und Jürgen Müller. Danke an Andreas Knespel für seine große Hilfe bei vielen Synchrotronreisen, die nicht unbedingt immer nur technischer Natur war.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Yves Muller für seine konkrete Hilfe bei der Lösung der Fehlordnungsstruktur der tRNA^{Ala}-MikroheliX bedanken. Er war zur richtigen Zeit an der richtigen Stelle und ist somit auch maßgeblich am Gelingen meiner Arbeit beteiligt.

Nicht vergessen möchte ich meine Kooperationspartner, ohne die alle Projekte nicht denkbar gewesen wären. Danke also an Mathias Sprinzl, Günter Ott und Harald Schübel für die langjährige Zusammenarbeit im Bereich des tRNA^{Ala}-MikroheliX-Projekts, Hermann Heumann, Luciano Cellai und Ihren Mitarbeitern für die Zusammenarbeit im Rahmen des HIV^{Chi}-Projekts und Franz X. Schmid und Dieter Perl für die Bereitstellung der Kälteschockproteine und die interessanten Diskussionen.

Monika Ühlein korrigierte meine Promotion und stand mir auch sonst immer mit Rat und Tat zur Seite.

Alle nichtgenannten Menschen mit denen ich zusammengearbeitet habe mögen nicht denken daß ich sie vergessen habe. Dem ist nicht so.

Curriculum vitae

- 1967 am 03. April 1967 in Berlin geboren
- 1973-1983 Besuch der Oberschule in Berlin
- 1983-1986 Besuch der Betriebsberufsschule des Chemiefaserwerk Premnitz
Lehre als Chemikant für Chemiefaserproduktion und Abitur
- 1986 Erlangung der Hochschulreife
- 1986-1989 Wehrdienst
- 1989 Studium der Chemie an der Humboldt-Universität zu Berlin
- 1991 Vordiplom in Chemie
- 1993-1994 Diplomarbeit in der Physikalischen Chemie bei Prof. Dr. Rettig
- 1994 Diplomprüfung in Physikalischer Chemie
- 1994-1999 Promotion auf dem Gebiet der Proteinkristallographie bei Prof. Dr. Heinemann am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde bislang noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 01. April 1999